

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –**  
**BIOQUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DOS METABÓLITOS ACUMULADOS NA**  
**DEFICIÊNCIA DA SULFITO OXIDASE SOBRE O METABOLISMO**  
**ENERGÉTICO E A HOMEOSTASE REDOX EM HIPOCAMPO, ESTRIADO E**  
**CEREBELO DE RATOS JOVENS**

**LEONARDO DE MOURA ALVORCEM**  
**ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHIAN LEIPNITZ**

**Porto Alegre, 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –**  
**BIOQUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DOS METABÓLITOS ACUMULADOS NA**  
**DEFICIÊNCIA DA SULFITO OXIDASE SOBRE O METABOLISMO**  
**ENERGÉTICO E A HOMEOSTASE REDOX EM HIPOCAMPO, ESTRIADO E**  
**CEREBELO DE RATOS JOVENS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências  
Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

**LEONARDO DE MOURA ALVORCEM**  
**ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHIAN LEIPNITZ**

**Porto Alegre, 2017**

CIP - Catalogação na Publicação

de Moura Alvorcem, Leonardo

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DOS METABÓLITOS  
ACUMULADOS NA DEFICIÊNCIA DA SULFITO OXIDASE SOBRE O  
METABOLISMO ENERGÉTICO E A HOMEOSTASE REDOX EM  
HIPOCAMPO, ESTRIADO E CEREBELO DE RATOS JOVENS /  
Leonardo de Moura Alvorcem. -- 2017.  
57 f.

Orientador: Guilhian Leipnitz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Bioquímica. 2. Erros Inatos do Metabolismo. 3.  
Deficiência da Sulfito Oxidase. 4. Estresse  
Oxidativo. 5. Metabolismo Energético. I. Leipnitz,  
Guilhian, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## Sumário

<b>PARTE I.....</b>	<b>4</b>
Resumo .....	5
Abstract.....	6
Lista de abreviaturas .....	7
I.1 Introdução .....	8
I.1.1 Erros inatos do metabolismo .....	8
I.1.2 Sulfito oxidase (SO) .....	10
I.1.3 Deficiência da sulfito oxidase .....	11
I.1.3.1 Sintomatologia e parâmetros bioquímicos .....	11
I.1.3.2 Aspectos neuropatológicos .....	12
I.1.3.3 Diagnóstico e tratamento .....	12
I.1.3.4 Fisiopatologia.....	13
I.1.4 Creatina Quinase (CK) .....	13
I.1.5 Acetilcolinesterase (AChE).....	14
I.1.6 Radicais livres e espécies reativas .....	15
I.1.7 Defesas antioxidantes .....	15
I.1.8 Estresse oxidativo.....	16
I.2 Justificativa.....	17
I.3 Objetivos.....	18
I.3.1 Objetivos gerais .....	18
I.3.2 Objetivos específicos.....	18
<b>PARTE II .....</b>	<b>20</b>
Artigo Científico .....	21
<b>PARTE III.....</b>	<b>22</b>
III.1 Discussão.....	23
III.2 Conclusões.....	26
III.3 Perspectivas.....	27
Lista de figuras.....	28
Referências.....	29

# **PARTE I**

## Resumo

A deficiência da sulfito oxidase (SO) é uma doença neurometabólica causada por uma deficiência isolada da enzima ou por defeitos na síntese do cofator molibdênio. Os pacientes apresentam sintomas neurológicos graves, cuja fisiopatologia não está totalmente esclarecida. No presente trabalho foram avaliados os efeitos *in vitro* do sulfito e do tiossulfato, metabólitos acumulados nessa deficiência, sobre as atividades das enzimas creatina quinase (CK) e acetilcolinesterase (AChE), e sobre a homeostase redox em hipocampo, estriado e cerebelo de ratos jovens. Também estudamos os efeitos *in vivo* de uma injeção intrahipocampal de sulfito sobre os mesmos parâmetros. Nos experimentos *in vitro*, sobrenadantes de hipocampo, estriado e cerebelo foram expostos ao sulfito ou tiossulfato (1-500  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h a 37 °C e, após essa incubação, os parâmetros bioquímicos foram determinados. Nossos resultados mostraram que o sulfito e o tiossulfato diminuíram a atividade da CK, e que o sulfito aumentou os níveis de malondialdeído (MDA) em todas as estruturas encefálicas. A diminuição da atividade da CK e o aumento dos níveis de MDA induzidos pelo sulfito foram prevenidos pelo tratamento com os antioxidantes melatonina e resveratrol. Também observamos que apenas o tiossulfato foi capaz de diminuir a atividade da AChE em hipocampo. Em relação ao sistema antioxidante, o sulfito aumentou as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo e estriado. Além disso, o sulfito diminuiu a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em todas as estruturas encefálicas, da glutathiona S-transferase em hipocampo e cerebelo, e da glutathiona redutase (GR) em cerebelo. Nos experimentos *in vivo*, os parâmetros foram analisados 30 min após a administração intrahipocampal do metabolito sulfito (2,5  $\mu\text{mol}$ ). De forma interessante, o sulfito aumentou a atividade da superóxido dismutase, sem alterar as atividades da GPx, GR e da CK. O metabolito também não alterou as concentrações de GSH, o conteúdo de sulfidrilas e os níveis de MDA. Pode ser sugerido que um prejuízo na transferência de energia, na homeostase redox e na atividade da AChE são patomecanismos importantes envolvidos no dano encefálico observado nos indivíduos com a deficiência da SO.

## Abstract

Sulfite oxidase (SO) deficiency is a neurometabolic disorder caused either by isolated deficiency in this enzyme or by defects in the synthesis of its molybdenum cofactor. Patients show severe neurological symptoms, whose pathophysiology is not yet established. In the present work, we evaluated the *in vitro* effects of sulfite and thiosulfate, two major metabolites accumulated in SO deficiency, on creatine kinase (CK) and acetylcholinesterase (AChE) activities, as well as on redox homeostasis in hippocampus, striatum and cerebellum of young rats. We also investigated the *in vivo* effects of sulfite intrahippocampal administration on the same biochemical parameters. In the *in vitro* experiments, supernatants of hippocampus, striatum and cerebellum were exposed to sulfite or thiosulfate (1-500  $\mu$ M) for 1 h at 37 °C and, afterwards the parameters were evaluated. Our results demonstrated that sulfite and thiosulfate reduced CK activity and that sulfite increased malondialdehyde (MDA) levels in all brain structures. Sulfite-induced decrease of CK activity and increase of MDA were prevented by melatonin and resveratrol. We also observed that thiosulfate decreased AChE activity only in hippocampus, whereas sulfite did not alter this parameter in any structure evaluated. Regarding the antioxidant system, sulfite increased the concentrations of reduced glutathione (GSH) in hippocampus and striatum. Furthermore, sulfite decreased the activity of glutathione peroxidase (GPx) in all brain structures, glutathione S-transferase in hippocampus and cerebellum, and glutathione reductase (GR) in the cerebellum. In the *in vivo* experiments, the parameters were analyzed in hippocampus supernatants 30 min after sulfite administration (2.5  $\mu$ mol). Sulfite injection increased the activity of superoxide dismutase, without altering the activities of GPx, GR and CK. In addition, the metabolite did not change GSH concentrations, sulfhydryl content and MDA levels. It may be suggested that energy transfer and redox homeostasis impairment, as well as decreased AChE activity are relevant pathomechanisms involved in brain damage observed in SO deficiency.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AChE – Acetilcolinesterase

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

CAT – Catalase

CK – Creatina Quinase

EIM – Erros inatos do metabolismo

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

Fe – Ferro

G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GST – Glutathione S-transferase

HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução

MDA – Malondialdeído

MEL – Melatonina

NADP<sup>+</sup> – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NMDA – N-metil-D-aspartato

RSV – Resveratrol

SNC – Sistema nervoso central

SO – Sulfito oxidase

SOD – Superóxido dismutase

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico



## **I.1 INTRODUÇÃO**

### **I.1.1 Erros Inatos do Metabolismo (EIM)**

Os erros inatos do metabolismo (EIM) constituem um grupo de doenças genética e fenotipicamente heterogêneas causadas por defeitos genéticos (mutações) que levam à diminuição ou perda total da atividade de uma enzima específica de uma determinada rota metabólica. Como consequência desse bloqueio metabólico há o acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes e a falta de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987; Mak et al., 2013).

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi proposto, em 1908, por Sir Archibald Garrod, para as doenças alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Fundamentado nas leis de Mendel e baseado em observações de que essas doenças eram mais frequentes em indivíduos da mesma família, embora os pais e outros parentes fossem normais, Garrod propôs um modelo de herança genética autossômica recessiva para esses distúrbios. Garrod também observou que alguns dos pacientes excretavam na urina quantidades aumentadas de determinadas substâncias intermediárias do metabolismo. Posteriormente, foi demonstrado que cada gene exercia influência sobre a síntese de uma determinada enzima que catalisa uma reação em cada rota metabólica. Baseado nessa demonstração, o conceito de EIM, proposto por Garrod, foi reformulado por Beadle & Tatum, em 1941, com a hipótese “um gene - uma enzima”. Esse conceito expressava que toda reação bioquímica estava sob controle de um único gene e que a mutação desse, resultando na modificação estrutural e funcional da enzima, ocasionava uma alteração da capacidade celular de realizar uma determinada reação química. O primeiro defeito enzimático causador de uma doença genética foi demonstrado por Gibson em 1948. Entretanto, a hipótese de Garrod só foi confirmada em 1958, quando La Du e colaboradores comprovaram a deficiência da oxidase do ácido homogentísico no fígado de um paciente com alcaptonúria. Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos líquidos biológicos dos pacientes, postulou-se que essas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver et al., 2001). Presumiu-se então, que em consequência desse bloqueio metabólico, pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Scriver et al., 2001).

Embora a sintomatologia dos EIM seja bastante variável, existem alguns sintomas e sinais clínicos que aparecem com maior frequência nestes distúrbios. Podemos citar os seguintes sintomas: retardo no crescimento; dificuldade alimentar; vômitos; diarreia; letargia ou coma; hipotonia; convulsões; dificuldade respiratória e apneia; icterícia; hepatomegalia; odor anormal da pele; dismorfias e anormalidade oculares (Scriver et al., 2001).

Mais de 600 diferentes EIM já foram identificados, sendo esses classificados em quatro grupos distintos: doenças de transporte, de armazenamento, de síntese e do metabolismo intermediário. Esse número vem crescendo constantemente à medida que novos conceitos e novas técnicas se tornam disponíveis para a identificação de fenótipos bioquímicos (Scriver et al., 2001; Alfadhel et al., 2013). Diversas classificações são usadas para os EIM. Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente e o tecido envolvido, considerando ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

a) doenças de transporte: envolvem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiência de dissacaridases e defeito no transporte de magnésio;

b) doenças de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomas, na sua grande maioria, provocando acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose;

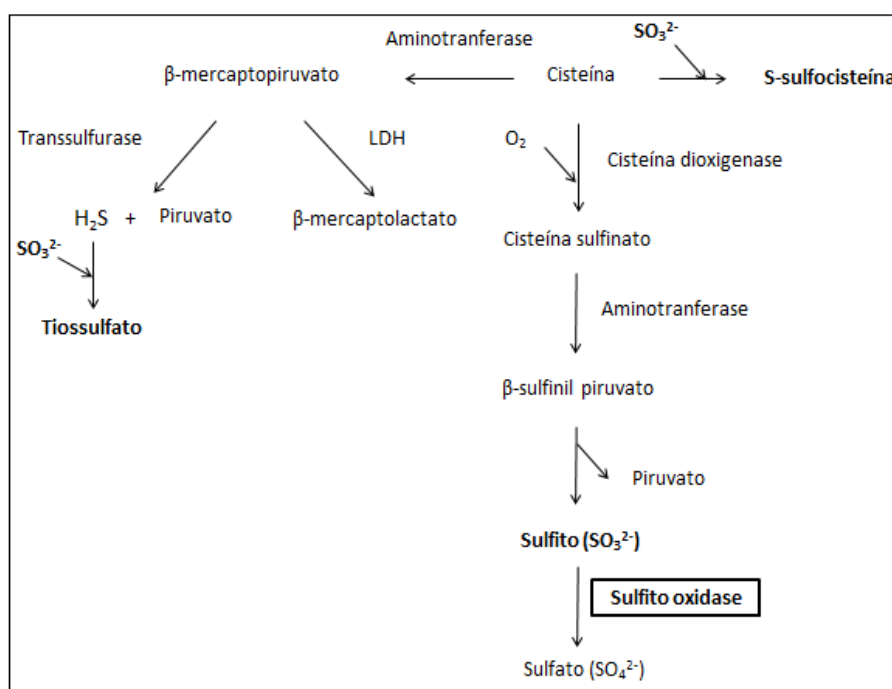
c) doenças de síntese: envolvem a síntese de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, estruturais, etc. Exemplo: hiperplasia adrenal congênita por deficiência na atividade da enzima 21-hidroxilase, hipogamaglobulinemia;

d) doenças do metabolismo intermediário: envolvem deficiências enzimáticas das rotas de metabolização de moléculas pequenas (aminoácidos, glicídios, neurotransmissores, etc.), podendo comprometer rotas importantes como os ciclos dos ácidos tricarboxílicos e da ureia, ou rotas relacionadas a essas. O bloqueio produz o acúmulo de substrato da enzima deficiente, bem como dos metabólitos produzidos a partir desse, além da deficiência do produto final da rota, caso não possa ser suprido por outra via metabólica. O acúmulo de metabólitos tóxicos pode causar outras alterações bioquímicas secundárias e danos nos tecidos. Como esses produtos são liberados na circulação, eles podem prejudicar outros tecidos, sendo finalmente excretados na urina.

Constituem o maior grupo do EIM e têm como exemplos as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as doenças do metabolismo das purinas, da frutose, galactose e pentose, dentre outros.

### I.1.2 Sulfito Oxidase (SO)

A SO (EC 1.8.3.1) é uma enzima mitocondrial que catalisa a oxidação de sulfito a sulfato, reação que participa da via de degradação dos aminoácidos sulfurados cisteína e metionina (Figura 1). Essa enzima também possui um importante papel na detoxificação do sulfito proveniente de fontes exógenas, uma vez que esse composto e derivados são amplamente utilizados em conservantes de alimentos e na indústria farmacêutica a fim de manter a estabilidade e a potência de alguns medicamentos (Gunnison e Palmes, 1973; Taylor et al., 1986; Chapman, 1993; Derin et al., 2006). A estrutura da SO consiste em um homodímero de aproximadamente 110 kDa, sendo que cada subunidade possui um domínio heme (ou citocromo b5) e um domínio de ligação do cofator molibdênio, além de um domínio de ancoragem que conecta os dois monômeros (C-terminal) (Kisker et al., 1997). O cofator molibdênio contém uma molécula de molibdopterina, à qual está ligado o molibdênio, sendo esse o responsável pela oxidação do sulfito com a redução do molibdênio (VI) para o molibdênio (IV). Os elétrons provenientes do sulfito são então transferidos um de cada vez através do heme b5 da enzima para o citocromo c da cadeia respiratória (Johnson e Duran, 2001).



**Figura 1.** Via do catabolismo da cisteína (Adaptado de Johnson e Duran, 2001).

Baseado nesse modelo de reação, o sulfito se ligaria ao cofator molibdênio, sofrendo oxidação de dois elétrons, sendo após liberado na forma de sulfato; em seguida, ocorreriam duas transferências intramoleculares de um elétron do cofator molibdênio para o Fe do grupamento heme e desse para o citocromo c. Esse “caminho” dos elétrons durante as transferências intramoleculares seria potencialmente facilitado por uma mudança conformacional no domínio de ligação entre os monômeros, aproximando o domínio do cofator molibdênio do grupamento heme, evitando, dessa forma, o vazamento de elétrons para o espaço intermembranas (Davis et al., 2013).

### **I.1.3 Deficiência da Sulfito Oxidase (SO)**

A deficiência da SO é um EIM de caráter autossômico recessivo que pode se manifestar sob duas formas: como uma deficiência isolada da enzima SO ou uma deficiência da SO causada pela falta do cofator molibdênio. Além de ser necessário para a reação da SO, esse cofator também é essencial para a atividade das enzimas xantina desidrogenase e aldeído oxidase (Edwards et al., 1999; Tan et al., 2005). Portanto, os portadores da deficiência do cofator molibdênio são deficientes nas atividades dessas três enzimas.

#### **I.1.3.1 Sintomatologia e Parâmetros Bioquímicos**

As duas formas da deficiência da SO têm sintomatologia similar, atribuindo-se os achados clínicos da deficiência do cofator molibdênio majoritariamente à deficiência da própria SO, sem consequências significativas dos defeitos da xantina desidrogenase e aldeído oxidase. Entretanto, os sintomas na deficiência isolada da SO têm início mais tardio e são mais heterogêneos, enquanto que a deficiência do molibdênio é uma doença geralmente fatal. A apresentação de ambas as formas da deficiência da SO é principalmente neurológica com a ocorrência de convulsões e hipotonia já nos primeiros dias de vida. Os pacientes também apresentam problemas respiratórios, dificuldades para se alimentar, retardo motor, atraso no desenvolvimento e subluxação do cristalino.

As alterações bioquímicas tipicamente encontradas incluem elevada excreção urinária de sulfito, tiosulfato e S-sulfocisteína (Basheer et al., 2007; Herken et al., 2009). No caso da deficiência do cofator molibdênio, além desses metabólitos, ainda são observados níveis urinários aumentados de taurina, xantina e hipoxantina, e diminuição do ácido úrico (Johnson et al., 2014).

### **I.1.3.2 Aspectos Neuropatológicos**

Os aspectos neuropatológicos característicos da deficiência da SO incluem perda massiva de neurônios, desmielinização e proliferação glial com anormalidades na substância branca. Exames de imagem demonstram dilatação dos ventrículos, diminuição da substância branca, encefalomalácia cística, atrofia cerebral e edema (Dublin et al., 2002; Tan et al., 2005; Sass et al., 2010; Chen et al., 2014). Atrofia cortical, leucoencefalopatia e anormalidades nos gânglios basais, tálamo e cerebelo (Rosenblum, 1968; Basheer et al., 2007; Bindu et al., 2011) também são frequentemente encontrados.

### **I.1.3.3 Diagnóstico e Tratamento**

Para o diagnóstico das duas formas de deficiência da SO, o sulfito é facilmente detectado na urina fresca através de uma fita indicadora de sulfito (Johnson e Duran, 2001). Entretanto, vários estudos indicam que o teste da fita de sulfito não é confiável devido à rápida oxidação do sulfito a sulfato em temperatura ambiente (Hobson et al., 2005; Ngu et al., 2009; Sass et al., 2010). Devido a isso, devem ser utilizadas técnicas mais sensíveis, como a espectrometria de massas em tandem ou quantificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), para detectar os outros metabólitos, em especial a S-sulfocisteína, que é mais estável que o sulfito (Johnson e Rajagopalan, 1995; Hobson et al., 2005). O diagnóstico diferencial da deficiência isolada da SO e da deficiência do cofator molibdênio é realizado a partir da medida dos níveis plasmáticos e urinários de ácido úrico, xantina e hipoxantina, visto que as enzimas xantina oxidase e aldeído oxidase também estão deficientes neste distúrbio. A confirmação do diagnóstico pode ser feita através da medida da atividade da SO em fibroblastos cultivados e análise mutacional (Sass et al., 2010). O diagnóstico pré-natal também é possível pela medida da atividade da SO em células amnióticas ou através de análise mutacional pré-natal (Reiss et al., 1999; Johnson et al., 2003; Johnson et al., 2014).

Na maioria dos casos, o tratamento sintomático é realizado com o objetivo de controlar as convulsões, apresentando pouco sucesso (Sass et al., 2010). O paciente também passa a ter restrição proteica na dieta visando diminuir o aporte de cisteína e metionina. Fármacos que reagem com o sulfito a fim de evitar que esse metabólito não interaja com moléculas endógenas têm sido desenvolvidos, porém são necessários mais estudos para estabelecer doses adequadas para esses fármacos (Johnson et al., 2014).

### **I.1.3.4 Fisiopatologia**

Apesar de os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de sintomas neurológicos encontrados nos pacientes afetados pela deficiência da SO ainda não estarem totalmente estabelecidos, evidências apontam para uma ação tóxica do sulfito. Estudos demonstraram que o sulfito sofre auto-oxidação gerando radicais livres (Mottley e Mason, 1988; Abedinzadeh, 2001; Baker et al., 2002) que induzem estresse oxidativo em cérebro e fígado de ratos *in vitro* (Chiarani et al., 2008; Derin et al., 2009). Já em ratos deficientes para a enzima SO foi verificado que concentrações aumentadas de sulfito alteram as defesas antioxidantes em córtex cerebral, induzem lipoperoxidação no hipocampo e disfunção energética em córtex cerebral e estriado, além de causarem déficit cognitivo (Küçükataý et al., 2005; Herken et al., 2009; Grings et al., 2016). Em um outro estudo, foi mostrado que o sulfito desregula a homeostase energética mitocondrial e induz a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Grings et al., 2014).

#### **I.1.4 Creatina Cinase (CK)**

A creatina cinase (CK) é uma enzima chave para a homeostase energética, sendo representada por um sistema de enzimas compartimentalizadas em locais onde há grande produção ou demanda de energia (Wallimann et al., 1992, 1998). A CK catalisa a reação reversível da transferência do grupo fosfato da fosfocreatina para o ADP, levando à formação de creatina e ATP. Essa enzima encontra-se principalmente em locais onde há geração de força por proteínas motoras, bomba de íons e outros processos que requerem a utilização de ATP.

Já foram descritos cinco tipos de isoenzimas de CK em vertebrados: três citosólicas e duas mitocondriais. As três isoformas citosólicas são formadas por dímeros compostos pelas subunidades M e B (M – *muscle*; B – *brain*). Dessa forma, elas são classificadas como (Wallimann et al., 1992; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000):

- CK-MM – encontrada no músculo esquelético;
- CK-BB – encontrada no cérebro e tecidos neurais;
- CK-MB – encontrada no coração e músculo esquelético em desenvolvimento.

Já as isoformas mitocondriais são classificadas como (Wallimann e Hemmer, 1994; Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000; Boero et al., 2003):

- CK-Mi ubíqua (CK-Mi<sub>u</sub>) – encontrada no músculo liso, cérebro e outros tecidos;
- CK-Mi sarcomérica (CK-Mi<sub>s</sub>) – encontrada nos ventrículos cardíacos e músculo esquelético.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado uma diminuição na atividade da CK em doenças neurodegenerativas comuns (Whittingham e Lipton, 1981; Adhihetty e Beal, 2008) e também em EIM (Grings et al., 2013; de Andrade et al., 2015). Nesse contexto, tem sido sugerido que tal alteração causa um prejuízo no metabolismo energético de diferentes tecidos de pacientes acometidos por essas doenças.

### **I.1.5 Acetilcolinesterase (AChE)**

A acetilcolina é um neurotransmissor sintetizado no citoplasma do terminal sináptico a partir de acetato e colina por ação da enzima colina-acetiltransferase. A ação da acetilcolina é finalizada por colinesterases presentes na sinapse (Lent, 2002; Massoulié, 2002). Dentre essas colinesterases, a AChE é comumente encontrada no SNC, músculo esquelético e na membrana de eritrócitos (Inestrosa e Perelman, 1990; Massoulié et al., 1993; Darvesh et al., 2003; Aldunate et al., 2004). Estudos mostram que essa enzima se encontra presente em estruturas com papel importante nas funções cognitivas, tais como: córtex cerebral, hipocampo, amígdala e tálamo (Darvesh et al., 2003; Graef et al. 2011; Pohanka, 2011). A inibição da atividade da AChE leva ao acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, podendo causar convulsões e ataques epiléticos (Olney et al., 1986, Kamkwala e Newhouse, 2016).

### **I.1.6 Radicais Livres e Espécies Reativas**

Radicaís livres são pequenas moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (Southorn e Powis, 1988; Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2015). Essas espécies químicas podem ser átomos, metais de transição ou uma molécula que possua um ou mais elétrons desemparelhados no orbital externo. Esse elétron confere uma alta reatividade à molécula, pois pode perder ou adquirir um segundo elétron para esse orbital (Halliwell, 2006).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico há a formação de radicaís livres e de espécies reativas. Na mitocôndria, o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) sofre redução tetravalente, com incorporação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H<sub>2</sub>O). No entanto, aproximadamente 3% do oxigênio utilizado na cadeia

respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido aos radicais livres ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e também à espécie reativa peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (Boveris, 1973; Sies, 2015).

O termo genérico “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do  $O_2$ , como por exemplo, os radicais superóxido e hidroxila, mas também algumas substâncias reativas não-reativas, como o peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 2015). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) os principais representantes. As ERO e ERN apresentam uma série de funções, tais como sinalização celular e síntese e regulação de proteínas (Ward e Peters, 1995; Irani, 2000; Wall et al., 2012), bem como a defesa do organismo contra infecções, realizada através da liberação de espécies reativas tóxicas pelos neutrófilos (Delanty e Dichter, 1998; Aratani et al., 2012). Entretanto, quando formadas excessivamente, essas espécies são capazes de causar danos celulares através da oxidação de diversas biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 2015).

### **1.1.7 Defesas Antioxidantes**

Com o objetivo evitar os efeitos danosos causados pelo excesso de espécies reativas, existem mecanismos eficientes para a detoxificação das mesmas: as defesas antioxidantes enzimáticas e antioxidantes não-enzimáticos endógenos ou derivados da dieta. Embora diferindo na sua composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo (Halliwell e Gutteridge, 2015) e compreendem:

- Defesas antioxidantes enzimáticas: podem ser citadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx), que atuam diretamente sobre as ERO; e as enzimas glutathione redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que têm papel fundamental na reciclagem de moléculas importantes para as defesas antioxidantes (glutathione reduzida-GSH, e NADPH, respectivamente).
- Defesas não-enzimáticas incluem moléculas que neutralizam ERO e ERN por interação direta, sem a necessidade de atividade enzimática, tais como a GSH e as vitaminas  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico, ou moléculas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como a transferrina que liga íons ferro.



### **I.1.8 Estresse Oxidativo**

As espécies reativas produzidas fisiologicamente são na sua maioria neutralizadas pelos sistemas de defesa antioxidante presentes no organismo. Entretanto, em determinadas condições patológicas há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua remoção pelos mecanismos de defesa antioxidante, o que dá origem a uma situação denominada estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Assim, o termo “estresse oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição que aceleram a produção de algumas espécies reativas, ou então da combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2006). Segundo Jones (Jones, 2006), uma situação de estresse oxidativo ainda é caracterizada por alterações na sinalização e controle redox, além do aumento dos níveis de oxidantes.

Se o desequilíbrio for grave, as defesas antioxidantes não serão suficientes e as espécies reativas oxidarão componentes importantes para a homeostase celular, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Dependendo da gravidade do dano, pode haver até mesmo a morte celular (por apoptose ou necrose).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

- Adaptação: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em um aumento da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço pró-oxidante / antioxidante.
- Dano celular: o estresse oxidativo pode provocar dano a alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (Halliwell e Gutteridge, 2015). Nesses casos, a resposta ao dano tecidual pode ser reversível: a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado, que não leva à morte celular.
- Morte celular: pode ocorrer principalmente por necrose ou apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a CAT e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo heme, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo induzi-las ao estresse oxidativo. Já na apoptose, um mecanismo intrínseco de morte programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode estar acelerada em certas

doenças, tais como as doenças neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2015).

## **I.2. JUSTIFICATIVA**

Pacientes acometidos pela deficiência da SO apresentam grave disfunção neurológica acompanhada de anormalidades no hipocampo, gânglios basais e cerebelo (Edwards et al., 1999; Johnson e Duran, 2001), cuja fisiopatologia não está totalmente esclarecida. Uma vez que essa doença é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de sulfito e tiosulfato nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (Johnson e Duran, 2001) e que evidências da literatura sugerem que esses compostos são neurotóxicos (Grings et al., 2013; Grings et al., 2014; de Andrade et al., 2015), torna-se relevante a investigação dos efeitos desses compostos sobre hipocampo, estriado e cerebelo de ratos para elucidar a etiopatogenia da deficiência da SO. Além disso, visto que não há tratamento eficiente para a deficiência da SO, também é interessante a avaliação da influência de moléculas com propriedades antioxidantes, tais como a melatonina (MEL) e resveratrol (RSV), sobre a possível toxicidade dos metabólitos acumulados.

## **I.3. OBJETIVOS**

### **I.3.1. Objetivos Gerais**

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos *in vitro* do sulfito e do tiosulfato sobre parâmetros de metabolismo energético e estresse oxidativo em hipocampo, estriado e cerebelo de ratos jovens. Também foram avaliados os efeitos *in vivo* do sulfito em hipocampo de ratos jovens.

### **I.3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre a atividade da CK;
- Estudar os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre a atividade da AChE;
- Avaliar os efeitos do sulfito sobre os níveis de malondialdeído (MDA);
- Investigar os efeitos do sulfito sobre as concentrações de GSH e sobre as atividades das enzimas antioxidantes GPx, GR e GST;

- Determinar se os antioxidantes MEL e RSV podem prevenir os efeitos induzidos *in vivo* pelo sulfito sobre os níveis de (MDA) e a atividade da CK em hipocampo, estriado e cerebelo de ratos;

- Avaliar os efeitos *in vivo* da administração intrahipocampal do sulfito sobre: medida de níveis de MDA, conteúdo de sulfidrilas, concentrações de GSH e sobre as atividades da CK, GPx, GR e SOD.

## **PARTE II**

## **Artigo Científico**

### **Disruption of energy transfer and redox status by sulfite in hippocampus, striatum and cerebellum of developing rats**

Leonardo de Moura Alvorcem, Mateus Struecker da Rosa, Nicolás Manzke Glänzel, Belisa Parmeggiani, Mateus Grings, Felipe Schmitz, Angela T.S. Wyse, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz.

Submetido para publicação na *Neurotoxicity Research*

## **PARTE III**

### III.1 DISCUSSÃO

A deficiência da SO (tanto a deficiência isolada da enzima quanto a deficiência do cofator molibdênio) é caracterizada bioquimicamente por acúmulo tecidual e alta excreção urinária de sulfito, tiosulfato e S-sulfocisteína (Johnson e Duran, 2001). Os pacientes apresentam predominantemente convulsões neonatais graves (Tan et al., 2005; Basheer et al., 2007; Ngu et al., 2009), cuja patogênese tem sido atribuída à neurotoxicidade dos metabólitos acumulados (Küçükataý et al., 2005; Chiarani et al., 2008; Derin et al., 2009; Herken et al., 2009; Ozturk et al., 2010). Por outro lado, é importante ressaltarmos que os mecanismos de toxicidade exercidos por esses compostos não estão totalmente estabelecidos, especialmente no que se refere ao dano nos gânglios basais, hipocampo e cerebelo. Visto que disfunção bioenergética e estresse oxidativo estão envolvidos na fisiopatologia de muitas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Kim GH et al., 2015; Tonnies e Trushina, 2017), hipotetizamos que tais mecanismos também estejam envolvidos na deficiência da SO. Nesse contexto, já foi visto que o sulfito causa um prejuízo na bioenergética e na homeostase redox em córtex cerebral de ratos (Vincent et al., 2004; Zhang et al., 2004; Grings et al., 2013).

Primeiramente avaliamos os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre a atividade da CK, uma importante enzima para a transferência celular de energia. O sulfito e o tiosulfato diminuíram essa atividade enzimática de maneira dose-dependente em estriado, hipocampo e cerebelo. Nesse particular, já está bem descrito que a CK possui um papel fundamental para a função encefálica através do transporte de ligações fosfato de alta energia dos seus sítios de produção na matriz mitocondrial para seus sítios de consumo no citosol, mantendo os níveis de ATP estáveis na célula (Wendt et al., 2003; Du et al., 2013). Sendo assim, o sulfito e o tiosulfato causam um prejuízo no transporte e tamponamento de energia intracelular.

A CK possui resíduos de aminoácidos bastante vulneráveis, como a cisteína 282 do seu sítio ativo, a agentes oxidantes (Wang et al., 2001; Wendt et al., 2003; Li et al., 2011). De fato, já foi demonstrado que a atividade da CK cerebral diminui após a exposição a moléculas que induzem a produção de espécies reativas (Burmistrov et al., 1992; Wolosker et al., 1996; Arstall et al., 1998; Konorev et al., 1998; Stachowiak et al., 1998; Wallimann et al., 1998; Wendt et al., 2003). Tendo em vista essa suscetibilidade da CK frente a agentes oxidantes, foi investigado o efeito de antioxidantes sobre a

inibição dessa enzima causada por sulfito. Observamos que a MEL (1500  $\mu$ M) preveniu a inibição da CK causada pelo sulfito em hipocampo e estriado, porém em cerebelo a MEL atenuou esse efeito. Também testamos o efeito do RSV (100  $\mu$ M) e verificamos uma atenuação do efeito do sulfito sobre a atividade da CK nas três estruturas encefálicas. Esses dados sugerem que o sulfito causa a oxidação de grupamentos da CK através de radicais livres, os quais são possivelmente sequestrados pela MEL e pelo RSV. Ainda pode ser sugerido que mais especificamente o radical hidroxila está envolvido nesse efeito, uma vez que a MEL é um eficiente sequestrador desse radical (Galano, 2011; Tamura et al., 2013; Halliwell e Gutteridge, 2015). Entretanto, não pode ser descartado o envolvimento de outras espécies reativas nesse efeito, uma vez que já foi demonstrado que tanto a MEL quanto o RSV também podem sequestrar peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e óxido nítrico (Reiter et al., 2001).

Considerando que o sulfito e o tiosulfato diminuíram a atividade da CK através da ação de radicais livres, avaliamos os efeitos do sulfito sobre parâmetros de estresse oxidativo nas três regiões encefálicas. O sulfito aumentou os níveis de MDA em hipocampo, estriado e cerebelo. Visto que o MDA é um produto final da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, concluímos que sulfito induz peroxidação lipídica *in vitro*. A peroxidação lipídica é um processo danoso para a célula visto que pode comprometer as membranas lipídicas, resultando em alterações na organização, fluidez e permeabilidade das mesmas, além de alterar o transporte de íons e os processos metabólicos (Yadav et al., 2013). Também investigamos os efeitos da MEL e do RSV sobre esse parâmetro e verificamos que a MEL preveniu totalmente a lipoperoxidação induzida pelo sulfito, ao passo que o RSV preveniu ou atenuou esse efeito.

Outra observação importante foi de que o sulfito provocou um aumento significativo nas concentrações de GSH em hipocampo e estriado. Presume-se que esse efeito se deve à habilidade do sulfito de reagir com ligações dissulfeto, formando assim grupamentos tióis, como demonstrado em estudos anteriores (Robinson e Pasternak, 1964; Niknahad e O'Brien, 2008; Parmeggiani et al., 2015). Essas observações mostram que o sulfito é uma molécula redox que leva à desregulação da homeostase do metabolismo do GSH no cérebro.

Uma vez que o sulfito foi capaz de causar dano lipídico e alterar o metabolismo da GSH, analisamos as atividades de enzimas antioxidantes GPx, GST e GR. É importante ressaltar que essas enzimas realizam funções de detoxificação de espécies



reativas e compostos potencialmente neurotóxicos. Foi observado que as enzimas tiveram suas atividades diminuídas pelo sulfito, principalmente a GPx, que foi inibida de forma acentuada em todas as estruturas encefálicas. Pode ser sugerido que o efeito inibitório exercido pelo sulfito ocorra devido a modificações sítio-específicas em aminoácidos importantes para a atividade catalítica ou para a manutenção da estrutura tridimensional das enzimas. Além disso, é importante considerar que as modificações nas estruturas das enzimas antioxidantes e também da CK possam ser mediadas por espécies reativas produzidas via sulfito ou por ataque direto do sulfito em certos grupamentos dissulfeto.

O próximo passo foi o de estudar a ação do sulfito e do tiosulfato sobre a atividade da AChE em hipocampo, estriado e cerebelo, uma vez que há dados na literatura mostrando que alterações colinérgicas estão envolvidas na fisiopatologia de alguns distúrbios neurodegenerativos, tais como demência (Blokland, 1995; Petersen et al., 1999; O'Brien et al., 2003; Ballard et al., 2005). O sulfito não alterou a atividade da AChE em nenhuma estrutura encefálica, porém o tiosulfato diminuiu essa atividade em hipocampo, indicando que esse metabólito leva à desregulação da neurotransmissão colinérgica nessa região. Esses dados indicam que a inibição da atividade da AChE causada pelo tiosulfato tenha sido mediada por espécies reativas, já que resultados anteriores do nosso grupo mostram que o tiosulfato aumenta a oxidação de DCFH em cérebro de ratos (Grings et al., 2013). Contudo, são necessários mais estudos para entender os mecanismos envolvidos nesse efeito e também para esclarecer porque somente o tiosulfato, e não o sulfito, diminuiu essa atividade enzimática.

Após investigar os efeitos *in vitro* do sulfito e do tiosulfato, estudamos os efeitos de uma injeção intrahipocampal de sulfito (2,5  $\mu\text{mol}$ ) sobre os mesmos parâmetros analisados *in vitro* em hipocampo de ratos. Investigamos os efeitos *in vivo* apenas do sulfito, e não do tiosulfato, pelo fato de esse ser o composto que se acumula em maiores concentrações na deficiência da SO. A administração de sulfito aumentou a atividade da SOD, porém não alterou os níveis de MDA, as concentrações de GSH, o conteúdo de sulfidrilas, e as atividades da CK, GR e GPx. Visto que os resultados *in vivo* estão em aparente controvérsia com os dados *in vitro*, uma vez que o sulfito causou toxicidade *in vitro*, foi avaliada uma dose maior desse metabólito (3  $\mu\text{mol}$ ). Contudo, verificamos que, ao administrar a dose maior de sulfito, os animais foram à óbito logo

após a injeção. Apesar da análise da homeostase redox e bioenergética não ter sido possível, tal observação sugere que o sulfito é neurotóxico *in vivo*.

Nossos achados demonstraram que o cerebelo é mais vulnerável ao ataque de espécies reativas geradas pelo sulfito e pelo tiosulfato do que hipocampo e estriado, visto que os níveis de MDA e as atividades da CK e da GR foram alteradas de forma mais acentuada nessa estrutura. Esses resultados diferem das observações de Grings et al. (2016), onde foi evidenciado que o estriado é mais suscetível ao sulfito que hipocampo, córtex cerebral e cerebelo. Essas diferenças podem ter ocorrido porque no trabalho de Grings foram avaliados os efeitos de uma exposição crônica *in vivo* de sulfito, enquanto que no presente estudo foi realizada uma exposição aguda *in vitro* dos metabólitos nas regiões encefálicas.

O nosso trabalho mostra que o sulfito e o tiosulfato causaram disfunção bioenergética e estresse oxidativo *in vitro* em hipocampo, estriado e cerebelo. É importante considerar que os efeitos causados por esses metabólitos ocorreram em concentrações relativamente baixas (já na concentração de 10  $\mu$ M), o que indica que mesmo um acúmulo moderado de sulfito e tiosulfato pode induzir toxicidade. Portanto, presumimos que alterações no metabolismo energético e na homeostase redox são patomecanismos que estão envolvidos, pelo menos em parte, no dano observado em diferentes estruturas encefálicas de pacientes com deficiência da SO.

### III.2. CONCLUSÕES

- O sulfito e tiosulfato inibiram a atividade da CK em hipocampo, estriado e cerebelo.
- O sulfito induziu peroxidação lipídica em hipocampo, estriado e cerebelo.
- Os antioxidantes MEL e RSV preveniram a diminuição da atividade da CK e a peroxidação lipídica causadas pelo sulfito em hipocampo, estriado e cerebelo.
- O sulfito aumentou os níveis de GSH em hipocampo e estriado.

- O sulfito diminuiu a atividade da GPx em hipocampo, estriado e cerebelo.
- O sulfito diminuiu a atividade da GST em hipocampo e cerebelo.
- O sulfito diminuiu a atividade da GR em cerebelo.
- O tiosulfato diminuiu a atividade da AChE em hipocampo.
- A administração de sulfito diminuiu a atividade da SOD em hipocampo.

### **III.3. PERSPECTIVAS**

- Testar diferentes doses de sulfito (2,5-3,0  $\mu\text{mol}$ ) para a administração intrahipocampal e intracerebelar com o objetivo de estabelecer uma dose ideal desse metabólito.
- Avaliar os efeitos da administração intrahipocampal e intracerebelar de sulfito sobre o metabolismo energético e a homeostase redox em ratos de 15 e 30 dias de vida.
- Avaliar a influência de compostos potencialmente neuroprotetores (melatonina, resveratrol e bezafibrato) sobre os efeitos da administração intrahipocampal e intracerebelar de sulfito em ratos.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Via do catabolismo da cisteína.....	10
---	----

## REFERÊNCIAS

- Abedinzadeh Z, 2001. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can J Physiol Pharmacol.* 79:166-70.
- Adihetty PJ, Beal MF, 2008. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med.* 10(4):275-90.
- Aldunate R, Casar JC, Brandan E, Inestrosa NC, 2004. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Brain Res Rev.* 47(1-3):96-104.
- Alfadhel M, Al-Thihli K, Moubayed H, Eyaid W, Al-Jeraisy M, 2013. Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. *Arch Dis Child.* 98:454-61.
- Aratani Y, Miura N, Ohno N, Suzuki K, 2012. Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation. *Med Mycol J.* 53:123-8.
- Arstall MA, Bailey C, Gross WL, Bak M, Balligand JL, Kelly RA, 1998. Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 30:979-88.
- Baker MT, Dehring DJ, Gregerson MS, 2002. Sulfite supported lipid peroxidation in propofol emulsions. *Anesthesiology.* 97:1162-7.
- Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S, 2005. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res.* 2(3):307-18.
- Basheer SN, Waters PJ, Lam CW, Acquaviva-Bourdain C, Henderson G, Poskitt K, Hukin J, 2007. Isolated sulfite oxidase deficiency in the newborn: lactic acidemia and leukoencephalopathy. *Neuropediatrics* 38:38-41.
- Bickel H, 1987. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme.* 38:14-26.
- Bindu PS, Christopher R, Mahadevan A, Bharath RD, 2011. Clinical and imaging observations in isolated sulfite oxidase deficiency. *J Child Neurol.* 26:1036-40.
- Blokland A, 1995. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Brain Res Rev.* 21(3):285-300.

- Boveris A, Chance B, 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134:707-16.
- Burmistrov SO, Mashek OP, Kotin AM, 1992. The action of acute alcoholic intoxication on the antioxidant system and creatine kinase activity in the brain of rat embryos. *Eksp Klin Farmakol.* 55:54-6.
- Chapman K, 1993. Sulfite-containing pharmaceuticals. *CMAJ.* 148:714.
- Chen LW, Tsai YS, Huang CC, 2014. Prenatal multicystic encephalopathy in isolated sulfite oxidase deficiency with a novel mutation. *Pediatr Neurol.* 51(1):181-2.
- Chiarani F, Bavaresco CS, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wyse AT, 2008. Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. *Metab Brain Dis.* 23:123-32.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C, 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci.* 4(2):131-8.
- Davis AC, Cornelison MJ, Meyers KT, Rajapakshe A, Berry RE, Tollin G, Enemark JH, 2013. Effects of mutating aromatic surface residues of the heme domain of human sulfite oxidase on its heme midpoint potential, intramolecular electron transfer, and steady-state kinetics. *Dalton Trans.* 42(9):3043-9.
- de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Bonorino NF, Costa BM, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, 2015. Creatine and pyruvate prevent the alterations caused by tyrosine on parameters of oxidative stress and enzyme activities of phosphoryl transfer network in cerebral cortex of Wistar rats. *Mol Neurobiol.* 51(3):1184-94.
- Delanty N, Dichter MA, 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* 98:145-53.
- Derin N, Akpınar D, Yargıoğlu P, Agar A, Aslan M, 2009. Effect of alpha-lipoic acid on visual evoked potentials in rats exposed to sulfite. *Neurotoxicol Teratol.* 31:34-9.
- Derin N, Yargıoğlu P, Aslan M, Elmas O, Agar A, Aicigüzel Y, 2006. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health.* 22:233-40.

- Dublin AB, Hald JK, Wootton-Gorges SL, 2002. Isolated sulfite oxidase deficiency: MR imaging features. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23(3):484-5.
- Du F, Cooper A, Lukas SE, Cohen BM, Ongur D, 2013. Creatine kinase and ATP synthase reaction rates in human frontal lobe measured by (31)P magnetization transfer spectroscopy at 4T. *Magn Reson Imaging.* 31:102-8.
- Edwards MC, Johnson JL, Marriage B, Graf TN, Coyne KE, Rajagopalan KV, MacDonald IM, 1999. Isolated sulfite oxidase deficiency: review of two cases in one family. *Ophthalmology.* 106:1957-61.
- Galano A, 2011. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys Chem Chem Phys.* 13:7178-88.
- Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Marcowich, GF, Amaral AU, de Souza Wyse AT, Wajner M, Leipnitz G, 2013. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene* 531(2):191-8.
- Grings M, Moura AP, Amaral AU, Parmeggiani B, Gasparotto J, Moreira JC, Gelain DP, Wyse AT, Wajner M, Leipnitz G, 2014. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochim Biophys Acta.* 1842(9):1413-22
- Graef S, Schönknecht P, Sabri O, Hegerl U, 2011. Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology (Berl).* 215(2):205-29.
- Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Motta MM, Boldrini RM, August PM, Matté C, Wyse AT, Wajner M, Leipnitz G, 2016. Higher susceptibility of cerebral cortex and striatum to sulfite neurotoxicity in sulfite oxidase-deficient rats. *Biochim Biophys Acta.* 1862(11):2063-2074.
- Gunnison AF, Palmes ED, 1973. Persistence of plasma S-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 24:266-78.
- Halliwell B, 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18:685-716.

- Halliwell B, 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant. Physiol.* 141:312-322.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*, (Em: Halliwell B, Gutteridge JMC (Eds), 5ª edição, Oxford University Press, Oxford.
- Herken EN, Kocamaz E, Erel O, Celik H, Kucukatay V, 2009. Effect of sulfite treatment on total antioxidant capacity, total oxidant status, lipid hydroperoxide, and total free sulfhydryl groups contents in normal and sulfite oxidase-deficient rat plasma. *Cell Biol Toxicol.* 25:355-62.
- Hobson EE, Thomas S, Crofton PM, Murray AD, Dean JC, Lloyd D, 2005. Isolated sulphite oxidase deficiency mimics the features of hypoxic ischaemic encephalopathy. *Eur J Pediatr.* 164:655-9.
- Inestrosa NC, Perelman A, 1990. Association of acetylcholinesterase with the cell surface. *J Membr Biol.* 118(1):1-9.
- Irani K, 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 87:179-83.
- Johnson JL, Rajagopalan KV, 1995. An HPLC assay for detection of elevated urinary S-sulphocysteine, a metabolic marker of sulphite oxidase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 18:40-7.
- Johnson JL, Duran M, 2001. Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency, Em: Scriver CR, B.A., Valle D, Sly WS (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3181-3217.
- Johnson JL, 2003. Prenatal diagnosis of molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. *Prenat Diagn.* 23:6-8.
- Johnson JL, Duran M, 2014. Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. Em: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson K, Mitchell G (Eds.). Disponível em: <http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=971&sectionid=62640104>. Último Acesso em 07 de fevereiro de 2017.
- Jones DP, 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 8(9-10):1865-79.



- Kamkwalala AR, Newhouse PA, 2016. Beyond Acetylcholinesterase Inhibitors: Novel Cholinergic Treatments for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* [Epub ahead of print].
- Kisker C, Schindelin H, Pacheco A, Wehbi WA, Garrett RM, Rajagopalan KV, Enemark JH, Rees DC, 1997. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell.* 91:973-83.
- Kim GH, Kim JE, Rhie S, Yoon S, 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol.* (4):325-40.
- Konorev EA, Hogg N, Kalyanaraman B, 1998. Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 427:171-4.
- Küçükataş V, Savcıoğlu F, Hacıoğlu G, Yargıçoğlu P, Ağar A, 2005. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. *Neurotoxicol Teratol.* 27:47-54.
- Lent R, 2002. Processamento de informação e transmissão de mensagens através das sinapses. Em: Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, Ed Atheneu. Cap. 4, pp. 97-132.
- Li C, Sun S, Park D, Jeong HO, Chung HY, Liu XX, Zhou HM, 2011. Hydrogen peroxide targets the cysteine at the active site and irreversibly inactivates creatine kinase. *Int J Biol Macromol.* 49:910-6.
- Mak CM, Lee HC, Chan AY, Lam CW, 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 50:142-62.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM, 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol.* 41(1):31-91.
- Massoulié J, 2002. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals.* 11(3):130-43.
- Mottley C, Mason RP, 1988. Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (Bi)sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 267:681-9.

- Ngu LH, Afroze B, Chen BC, Affandi O, Zabedah MY, 2009. Molybdenum cofactor deficiency in a Malaysian child. *Singapore Med J.* 50:e365-7.
- Niknahad H, O'Brien PJ, 2008. Mechanism of sulfite cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 174 (3):147–154.
- O'Brien KK, Saxby BK, Ballard CG, Grace J, Harrington F, Ford GA, O'Brien JT, Swan AG, Fairbairn AF, Wesnes K, del Ser T, Edwardson JA, Morris CM, McKeith IG, 2003. Regulation of attention and response to therapy in dementia by butyrylcholinesterase. *Pharmacogenomics J.* 13:231–239.
- Olney JW, Collins RC, Sloviter RS, 1986. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol.* 44:857-77.
- Ozturk OH, Oktar S, Aydin M, Kucukatay V, 2010. Effect of sulfite on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in normal and sulfite oxidase-deficient rat erythrocytes. *J Physiol Biochem.* 66:205-12.
- Parmeggiani B, Moura AP, Grings M, Bumbel AP, de Moura Alvorcem L, Tauana Pletsch J, Fernandes CG, Wyse AT, Wajner M, Leipnitz G, 2015. In vitro evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci.* 42:68-75.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E, 1999. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 56:303–308.
- Pohanka M, 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap.* 155(3):219-29.
- Reiss J, Christensen E, Dorche C, 1999. Molybdenum cofactor deficiency: first prenatal genetic analysis. *Prenat Diagn.* 19(4):386-8.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W, 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys.* 34:237-56.
- Robinson HC, Pasternak CA, 1964. The isolation of S-sulphoglutathione from the small intestine of the rat. *Biochem J.* 93(3):487-92.

Rosenblum WI, 1968. Neuropathologic changes in a case of sulfite oxidase deficiency. *Neurology*. 18:1187-96.

Sass JO, Gunduz A, Araujo Rodrigues Funayama C, Korkmaz B, Dantas Pinto KG, Tuysuz B, Yanasse Dos Santos L, Taskiran E, de Fátima Turcato M, Lam CW, Reiss J, Walter M, Yalcinkaya C, Camelo Junior JS, 2010. Functional deficiencies of sulfite oxidase: Differential diagnoses in neonates presenting with intractable seizures and cystic encephalomalacia. *Brain Dev*. 32:544-9.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 2001. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>o</sup> edição, McGraw-Hill, New York.

Sies H, 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 4:180-3.

Sinclair L, 1982. A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem*. 19 (Pt 4):314-321.

Southorn PA, Powis G, 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*. 63:381-9.

Stachowiak O, Dolder M, Wallimann T, Richter C, 1998. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem*. 273:16694-9.

Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N, 2013. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr J*. 60:1-13.

Tan WH, Eichler FS, Hoda S, Lee MS, Baris H, Hanley CA, Grant PE, Krishnamoorthy KS, Shih VE, 2005. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics*. 116:757-66.

Taylor SL, Higley NA, Bush RK, 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv Food Res*. 30:1-76.

Tönnies E, Trushina E, 2017. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. [Epub ahead of print]

- Vincent AS, Lim BG, Tan J, Whiteman M, Cheung NS, Halliwell B, Wong KP, 2004. Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells. *Kidney Int* 65:393-402.
- Wall SB, Oh JY, Diers AR, Landar A, 2012. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. *Front Physiol.* 3:369.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM, 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 1;281 ( Pt 1):21-40.
- Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, Kraft T, Stolz M, 1998. Creatine kinase: an enzyme with a central role in cellular energy metabolism. *MAGMA.* 6:116-9.
- Wang PF, McLeish MJ, Kneen MM, Lee G, Kenyon GL, 2001. An unusually low pK(a) for Cys282 in the active site of human muscle creatine kinase. *Biochemistry.* 40:11698-705.
- Ward R, and Peters T, 1995. Free Radicals in: Marshall W, and Bangert S, (Eds.), *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.* Churchill Livingstone, New York, pp. 765-777.
- Wendt S, Schlattner U, Wallimann T, 2003. Differential effects of peroxynitrite on human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. Inactivation, octamer destabilization, and identification of involved residues. *J Biol Chem.* 278:1125-30.
- Whittingham TS, Lipton P, 1981. Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J Neurochem.* 37(6):1618-21.
- Wolosker H, Panizzutti R, Engelender S, 1996. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett.* 392:274-6.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R, 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 80(3):1107-213.
- Yadav UC, Ramana KV, 2013. Regulation of NF- $\kappa$ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev.* 2013:690545.

Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP, 2004. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 279:43035-45.